

Afdeling Organische Contaminanten

1986-01-20

RAPPORT 86.07

Pr. nr. 505.0070

Onderwerp: Voorkomen van metabolieten van
nortestosteron in urine afkomstig van met
exogene hormonen behandelde stierkalveren.

Bijlagen: 4.

Voorgaande verslagen: 85.94 en 85.124.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd, afdeling OCON (4x),
projektleider, projectbeheer, bibliotheek (2x), circu-
larisatie, afdeling SERH (2x), Den Hartog, H. Frijs.

Project: Ontwikkelen methoden voor het verrichten van identifikaties
c.q. confirmaties.

Onderwerp: Voorkomen van metaboliëten van nortestosteron in urine af-
komstig van met exogene hormonen behandelde stierkalveren.

Bijlagen: 4.

Voorgaande verslagen: 85.94, 85.124.

Doel:

Onderzoek van urine afkomstig van met diverse exogene hormonen behandelde runderen op 17α -nortestosteron en 5α -estrane $3\beta,17\alpha$ -diol met het doel aan te tonen dat deze componenten alleen ontstaan na een behandeling met 17β -nortestosteron (= 17β -hydroxy-4-estren-3-one = 19 nortestosteron).

Samenvatting:

Een groep van 8 stierkalveren is per 2 dieren behandeld met een hormoonpreparaat van respectievelijk 17β -nortestosteronlauraat/ 17β -estradiolbenzooat, methyltestosteron/ 17β -estradiolbenzooat en medroxyprogesteronacetaat/ 17β -estradiolbenzooat.

Op diverse dagen rond het injectietijdstip zijn urinemonsters genomen en onderzocht. De resterende 2 dieren fungeren als blanco.

Conclusie:

Uit de meetresultaten komt duidelijk naar voren dat er een eenduidige relatie bestaat tussen het injecteren van esters van 17β -nortestosteron bij een stierkalf en de aanwezigheid van 17α -nortestosteron en 5α -estrane $3\beta,17\alpha$ -diol in de urine. Dit houdt in dat uit 17β -nortestosteron ester deze componenten wel en dat ze uit esters van methyltestosteron en medroxyprogesteron niet ontstaan.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra *HT*

Medewerker/samensteller: ing. P.G.M. Kienhuis *P.G.M. Kienhuis*

Projectleider: W.A. Traag *W.A. Traag*

Inleiding

Bij het IVVO is een proef opgezet met 8 stierkalveren. Per 2 dieren wordt een behandeling met een hormoonpreparaat uitgevoerd (twee dieren fungeren als blanco). De volgende combinaties van hormoonesters werden gebruikt: 17β -nortestosteron/ 17β -estradiol, medroxyprogesteron/ 17β -estradiol en methyltestosteron/ 17β -estradiol (voor nadere gegevens zie bijlage 1).

De urinemonsters, genomen op verschillende dagen rond het injectietijdstip, worden voor dit verslag gebruikt om aan te tonen, dat er een directe relatie bestaat tussen het injecteren of implanteren van 17β -nortestosteronlauraat bij stierkalveren en de aanwezigheid van de metabolieten 17α -nortestosteron en 5α -estrane $3\beta,17\alpha$ -diol in de urine ervan. Dit houdt tevens in dat deze componenten niet mogen voorkomen in de urine van onbehandelde c.q. van met andere hormonen behandelde dieren. Over dit onderwerp zijn reeds enige verslagen verschenen (1,2).

Methoden

De monsters zijn opgewerkt volgens RIKILT voorschrift A 229 (F 74). De analyses zijn in eerste instantie verricht op een HP MSD 5970 GCMS met een CP Sil 5 capillaire kolom.

Indien een van de componenten gestoord wordt door matrixinvloeden, vindt er een heranalyse plaats op een Finnigan 4500 GCMS met een CP Sil 19 capillaire kolom.

Voor 17α en 17β nortestosteron wordt gekeken naar de massa's m/z 215; 256; 331 en 346. Voor estrane diol naar m/z 242; 332 en 407.

Het meest intense massa fragment per component, (zie ook (1)) wordt gebruikt voor het berekenen van de gehalten. (Hierboven onderstreept). Voor het berekenen van de afwezigheidsgrens (gehalte, waarboven een component afwezig is) wordt op de juiste retentietijd van een component gekeken naar de intensiteit van m/z 256 cq. 242 in de ruï. Door te vergelijken met een standaard kan hieruit een "gehalte" berekend worden. Voor de huidige methode varieert deze waarde van $< 0,1$ tot $< 0,5$ ppb in de urine afhankelijk van matrix, componenten en gevoeligheid van de apparatuur.

Een component wordt positief verklaard, indien de retentietijd niet afwijkt ($\pm$ 5 sec) ten opzichte van de standaard en indien de massa-verhouding ten opzichte van het meest intense massafragment niet afwijkt ($\pm$ 10%) ten opzichte van de massaverhouding in de standaard. Het gehalte wordt berekend door de intensiteit van m/z 256 cq. 242 in standaard en monster te vergelijken.

Ter controle van de opwerking zijn een aantal blanco urines meegenomen, waaraan resp. 10 ppb 17- β -NT, 17- α -NT en 5 α -estrane 3 β , 17 α -diol is toegevoegd.

N.B. Voor het hormoonmengsel medroxyprogesteronacetaat/17 β -estradiolbenzooat is, in plaats van de normale TMS derivatisering, gebruik gemaakt van een methoxine-TMS derivatisering (zie RIKILT voorschrift F 100).

Dit is gedaan om ook een indruk te kunnen krijgen van de eventuele aanwezigheid van medroxyprogesteron in urine. Deze component wordt n.l. niet gederivatiseerd met de normale TMS-procedure uit voorschrift F 74.

De methoxine reactie heeft geen effect op estranediol maar wel op nortestosteron. De massa's voor α - en β -nortestosteron worden daardoor m/z 375 (molecuul en basepeak); 360; 344 en 285.

Herkomst urines

Voor algemene gegevens over de proefopzet zie bijlage 1.

Bij de meetresultaten wordt aangegeven welke hormoonmengsel is toegediend en van welke dag en welk dier de urine afkomstig is.

Hormoonmengsel 17 β -nortestosteronlauraat/17 β -estradiolbenzooat

Meetresultaten:

De meetresultaten zijn weergegeven in bijlage 2.

De analyses op de Sil 5 kolom voor 17 β -nortestosteron werden gestoord door een component met deels gelijke massa's. Daarom is een deel van de analyses herhaald op de Finnigan 4500 met een Sil 19 kolom.

Bij de opwerking is een blanco urine meegenomen waaraan 10 ppb per component is geaddeerd. De recovery was goed.

Discussie

Uit de meetresultaten blijkt, dat er een duidelijke relatie bestaat tussen het injecteren van 17β -nortestosteronlauraat en de aanwezigheid van 5α -estrane $3\beta,17\alpha$ -diol en 17α -nortestosteron in de urine.

17β -nortestosteron wordt nauwelijks teruggevonden. Alleen op dag 3 kan bij één van de dieren 17β -nortestosteron positief bevonden worden op een niveau van ongeveer 2 ppb.

In verslag 85.124 (2) is een serie urines onderzocht afkomstig van dieren met een spuitplaats waarin 17β nortestosteron aangetoond is. Ook in die urines kwam 17β -nortestosteron niet voor.

In het uitscheidingspatroon van zowel 5α -estrane $3\beta,17\alpha$ -diol als 17α -nortestosteron komen soms discontinuïteiten in het gehalte voor. Dit wordt mede veroorzaakt door de wisselende hoeveelheden urine, die een dier per dag uitscheidt.

Conclusie

Uit de meetresultaten blijkt, dat er een duidelijke relatie bestaat tussen het injecteren van 17β -nortestosteronlauraat/ 17β -estradiolbenzooat bij runderen en de aanwezigheid van 5α -estrane $3\beta,17\alpha$ -diol en 17α -nortestosteron in de urine.

17β -nortestosteron wordt in de urine niet of nauwelijks teruggevonden.

Hormoonmengsel methyltestosteron/ 17β -estradiolbenzooat

Meetresultaten:

De meetresultaten zijn weergegeven in bijlage 3.

De analyses op de Sil 5 kolom voor 17β -nortestosteron werden deels gestoord door een component met een aantal gelijke massa's. Daarom is een deel van de analyses herhaald op de Finnigan 4500 met een Sil 19 kolom.

Bij de opwerking is een blanco urine meegenomen waaraan 10 ppb per component is geaddeerd. De recovery was goed.

Discussie

De meetresultaten laten duidelijk zien dat geen van de gezochte componenten aanwezig is.

Conclusie

Na het injekteren van een hoeveelheid methyltestosteron/17 β -estradiolbenzooat in een stierkalf wordt geen 17 β -nortestosteron, 17 α -nortestosteron c.q. 5 α -estrane 3 β ,17 α -diol in de urine aangetroffen.

Hormoonmengsel medroxyprogesteronacetaat/17 β -estradiolbenzooat

Meetresultaat:

De meetresultaten zijn weergegeven in bijlage 4.

De analyses op de Sil 5 kolom voor 17 β -nortestosteron werden deels gestoord door een component met een aantal massa's gelijk aan die van β -nortestosteron. Daarom is een deel van de analyses herhaald op de Finnigan 4500 met een Sil 19 kolom. Bij de opwerking zijn een blanco-urine en een chemicaliën-blanco, waaraan 10 ppb per component is geaddeerd meegenomen. De recovery was goed.

Discussie

De meetresultaten laten duidelijk zien, dat geen van de gezochte componenten aanwezig is.

Conclusie

Na het injekteren van een hoeveelheid medroxyprogesteronacetaat/17 β -estradiolbenzooat in een rund, wordt geen 17 β -nortestosteron, 17 α -nortestosteron c.q. 5 α -estrane 3 β ,17 α -diol in de urine aangetroffen.

Algemene discussie

Uit de meetresultaten van de diverse experimenten blijkt duidelijk dat er een direkte relatie bestaat tussen het injekteren van 17 β -nortestosteronlauraat/17 β -estradiolbenzooat in een stierkalf en de aanwezigheid van 17 α -nortestosteron en 5 α -estrane 3 β ,17 α -diol in de urine ervan. Tevens blijkt dat een injectie van respectievelijk methyltestosteron/17 β -estradiolbenzooat en medroxyprogesteronacetaat/17 β -estradiolbenzooat geen van bovengenoemde componenten genereerd. Bij de metingen is tevens gekeken naar de aanwezigheid van de exogene hormonen in de urine.

Bij geen van de experimenten kon echter de bijbehorende component aangetoond worden. Alleen bij de nortestosteronproef kon bij één van de twee onderzochte dieren op dag 3 in de urine de aanwezigheid van een geringe hoeveelheid bevestigd worden. Blijkbaar worden de ingebrachte exogene hormonen alleen gemetaboliseerd uitgescheiden door het lichaam. Dit onderstreept de noodzaak om te zoeken naar eenduidige metaboliëten van de toegepaste hormonen.

Algemene conclusie

Uit de meetresultaten komt duidelijk naar voren dat er een eenduidige relatie bestaat tussen het injecteren van esters van 17β -nortestosteron bij een stierkalf en de aanwezigheid van 17α -nortestosteron en 5α -estrane $3\beta,17\alpha$ -diol. Dit houdt in dat uit 17β -nortestosteronester deze componenten wel en dat ze uit esters van methyltestosteron en medroxyprogesteron niet ontstaan.

Literatuur

1. RIKILT rapport 85.94: Voorkomen van metaboliëten van nortestosteron in urine afkomstig van onbehandelde runderen.
2. RIKILT rapport 85.124: Onderzoek naar metaboliëten van 17β -nortestosteron in kalverurine.

22 oktober 1984

Protocol-452-PBE/KVR-01

1. Titel

Vaststellen van gehalten van nortestosteron (NT), medroxyprogesteron (MP), methyltestosteron (MT) en hun belangrijkste metabolieten in bloed-plasma, urine, faeces, gal en eetbare weefsels bij mannelijke vleeskalveren die resp. met oestradiol/NT, oestradiol/MP en oestradiol/MT geïnjecteerd worden.

2. Doel

Uit het onderzoek van het RIVM naar de frequentie van het voorkomen van anabolica in spuitplaatsen (130) van slachtrunderen bleek dat in 98% van de gevallen NT aangetoond werd. Bij dit onderzoek bleek tevens dat in de meeste gevallen ook een oestrogene stof aangetoond werd (persoonlijke mededeling Stephany).

Uit onderzoek door het RIKILT van injectievloeistoffen afkomstig uit het illegale circuit bleek dat hierin vooral NT, 17- β estradiol en MP, alle in veresterde vorm voorkomen. Uit onderzoek van Berende is gebleken dat een androgene stof alleen geen of nagenoeg geen positieve invloed heeft op groei bij intacte mannelijke dieren (varkens, jonge stieren); wel in combinatie met een oestrogene stof. Het is dan ook niet verwonderlijk dat deze combinatie in de praktijk (clandestien) aangetroffen worden.

Uit het onderzoek van IVVO/RIKILT/RIVM bleek dat in de urine van stieren die een injectie met 250 mg nortestosteronlauraat hadden gehad geen NT aangetoond kon worden. Naar de metabolieten in urine en faeces wordt nog nader onderzoek verricht, evenals naar de gehalten van NT en zijn belangrijkste (meest waarschijnlijke) metabolieten in spier, lever, nier, vet, bloed en injectieplaats.

Uit het onderzoek van Stephany naar de aanwezigheid van NT in urine van monsters uit de praktijk blijkt dat in urine van (behandelde) stieren de concentratie van NT laag is (enkele ppb's) terwijl bij mestkalveren de gehalten iets hoger lijken te zijn bij de met NT behandelde dieren (5-10 ppb en soms wat hoger; persoonlijke mededeling Stephany). Als mogelijke oorzaken van het niet aan kunnen tonen van NT in urine van stieren uit bovengenoemde proef kunnen genoemd worden:

- De mogelijke te geringe dosis toegediend bij volwassen dieren met een volledig funktionerend endocrien systeem.
- NT is toegediend als enkelvoudige stof. Uit onderzoek van Berende is bekend dat bij een combinatie van een androgene en een oestrogene stof beide stoffen elkaar beïnvloeden met betrekking tot de release uit de implantatie c.q. injectieplaats. Zo is het niet ondenkbaar dat beide stoffen elkaar ook beïnvloeden met betrekking tot hun metabolisme.

Daarom stellen wij hier een proef voor met jonge stierkalveren die met een combinatiepreparaat van oestradiol-17 β met resp. NT, MP en MT geïnjecteerd worden.

3. Proeftechniek

3.1. Proefgroepen

Dit proefje wordt uitgevoerd met 4 groepen, te weten een controlegroep bestaande uit twee dieren en drie proefgroepen elk bestaande uit twee dieren.

Groep I	Placebo, geïnjecteerd met drager
Groep II	20 mg 17 β -oestradiolbenzonaat/200 mg nortestosteronlauraat (geïnjecteerd met 4 ml)
Groep III	20 mg 17 β -oestradiolbenzaat/200 mg medroxyprogesteronacetaat (geïnjecteerd met 4 ml)
Groep IV	20 mg 17 β -oestradiolbenzooat/200 mg methyltestosteron (geïnjecteerd met 4 ml)

3.2. Proefdieren

Aantal	:	8		
Soort	:	vleeskalveren		
Ras	:	FH of een hiervan afgeleide kruising		
Geslacht	:	mannelijk		
Herkomst	:	Boerderij I.V.V.O.		
Geboortedatum	:	Data	Kalfnr.	Geb.gewicht
		01-10-84	1	41
		27-09-84	2	38
		03-10-84	3	46
		04-10-84	4	37
		06-10-84	5	47
		04-10-84	6	52
		06-10-84	7	36
		06-10-84	8	41

Leeftijd bij behandeling: ca. 9 weken

Gewicht bij behandeling : ca. 90 kg

Wijze van identifikatie : plastic oormerken (nr. 1 t/m 8)

3.3. Voorbehandeling proefdieren

De proefdieren zijn afkomstig van de veestapel van het I.V.V.O. en zijn tot het begin van de onderhavige proef op de gebruikelijke wijze als vleeskalveren gevoerd en gehuisvest.

3.4. Indeling proefdieren

Op 4 december 1984 worden de kalveren over de 4 proefgroepen verdeeld. Deze verdeling vindt plaats op grond van het levend gewicht, de groei tussen 15 oktober en 3 december 1984 en leeftijd der dieren.

3.5. Huisvesting

De dieren worden gehuisvest in kalverboxen voorzien van lattenroosters in de kalverstal. Deze stal wordt op natuurlijke wijze geventileerd.

3.6. Proefduur

De proef bestaat uit een voorperiode van 15 oktober tot 5 december 1984 en een proefperiode van 5 december tot 19 december 1984. De kalveren worden op 19 december 1984 geslacht in Harderwijk (slager Hoeve)

3.7. Controle en test substances

Placebo (controle substance): arachisolie code 01006-010403
benzylalcohol code 01032-010344

Test-substances: 17 β -oestradiolbenzoaat code 01561-010648
duosynth. 7331411

nortestosteronlauraat (nandrolonlauraat)
code 01501-010712
duosynth. 78054111

medroxyprogesteronacetaat: code nog niet bekend
duosynth. nog niet bekend

methyltesteron : code nog niet bekend
duosynth. nog niet bekend

Het preparaat oest/NT (JPno5506) bevat 5 mg oestradiol-17 β benzoaat en 50 mg nortestosteronlauraat per ml

Het preparaat oest/MP (JPno) bevat 5 mg oestradiol-17 β benzoaat en 50 mg medroxyprogesteronacetaat per ml.

Het preparaat oest/MT (JPno) bevat 5 mg oestradiol-17 β benzoaat en 50 mg methyltestosteron per ml.

Alle preparaten worden gemaakt en zijn ons ter beschikking gesteld door Intervet, Boxmeer (bemiddeling door dr. Coert)

3.8. Rantsoenen

Aan de dieren wordt een in de praktijk gebruikt kunstmelkpreparaat verstrekt. Leverancier is C.A.V.V. "Alko" B.A. te Dronten. Fabrikant: Centrale Veevoederfabriek "Sloten" Merk: Spraymes-groen.

3.9. Voederwijze

De kalveren worden twee maal per dag gevoerd. De per dier per dag te verstrekken hoeveelheid kunstmelkpoeder is gebaseerd op het lichaamsgewicht van de dieren.

3.10. Veterinaire begeleiding

Bij een afwijkende gezondheidstoestand wordt de dierenarts gewaarschuwd, die verantwoordelijk is voor de veterinaire begeleiding. De in te stellen therapie mag niet strijdig zijn met het doel van de proef, d.w.z. de toe te dienen stoffen mogen de bepaling van NT, MP, MT en hun metabolieten en eventueel oestradiol niet verstoren.

Gestorven dieren moeten bij de dierenarts worden gemeld voor sectie.

4. Waarnemingen

- De voederopname wordt dagelijks genoteerd.
- De gezondheidstoestand wordt dagelijks gecontroleerd.
- Het gewicht van de dieren wordt eens per twee weken bepaald.
- Van alle dieren worden op de volgende data bloedplasma, faeces en urine verzameld: 4, 6, 7, 8, 11, 14, 17 en 19 december 1984.
- Bij het slachten worden injectieplaats, lever, nier, niervet, gal en spier(longhaasje en vangspier) verzameld.
- Monstername van het voer voor re en Fe-bepaling.
- Prostaat.

5. Analyses

- Re en Fe-bepaling in het voer door I.V.V.O.
- NT, MP en MT en hun metabolieten in onder punt 4 genoemde matrices door RIKILT en RIVM.

6. Statistische analyses

Niet van toepassing.

7. Veiligheidsmaatregelen

Niet van toepassing.

8. Wijzigingen en aanvullingen

Wijzigingen en aanvullingen in het protocol dienen onmiddellijk op een gedateerde en door de projectleider ondertekende bijlage te worden gegeven.

P.L.M. Berende

* Dier 2 (blanco) is vroegtijdig overleden. Uit praktische overweging is dier 1 vervolgens omgenummerd tot dier 2.

* Monster urine dier 2 proefdag 7 ontbreekt.

Hormoonmengsel 17 β -nortestosteronlauraat/17 β -estradiolbenzoaatMeetresultaten:

Dier nr. 2 en nr. 6 zijn behandeld met dit hormoonmengsel.

HP MSD 5790 met Sil 5 kolom

Monster nummer	Dag	ppb in urine		
		Estrane-diol	α -nortestosteron	β -nortestosteron
5/5/				
Dier 2				
909	-1	< 0,1	< 0,2	wordt
923	1	7,9	< 1,5	
937	2	2,8	< 0,9	
951	3	18,7	6,7	
- *	7	-	-	gestoord
979	10	16,9	8,9	
993	14	12,6	5,8	
Dier 6				
911	-1	< 0,1	< 0,1	
925	1	12,9	8,4	
939	2	12,7	< 2,5	
953	3	45,5	26,4	
967	7	42,8	29,5	
981	10	47,0	14,6	
995	14	10,8	26,3	

Finnigan 4500 met Sil 19 kolom

Monster nummer	Dag	ppb in urine		
		Estrane-diol	α -nortestosteron	β -nortestosteron
5/5/				
Dier 2				
951	3	niet gemeten	7,0	< 1,0
Dier 6				
939	2	niet gemeten	3,5	< 0,3
953	3	niet gemeten	18,0	2,0
981	10	niet gemeten	11,6	< 0,4

* Monster urine dier 2 proefdag 7 ontbreekt.

Meetwaarden die niet voldoen aan de criteria van retentietijd en massa verhouding worden voorafgegaan door een "<" teken.

Hormoonmengsel methyltestosteron/17 β -estradiolbenzoaatMeetresultaten:

Dier nr. 4 en nr. 5 zijn behandeld met dit hormoonmengsel. Alleen van dier 4 is de urine onderzocht.

HP MSD 5790 met Sil 5 kolom

Monster nummer	Dag	ppb in urine		
		Estrane-diol	α -nortestosteron	β -nortestosteron
5/5/				
919	-1	< 0,1	< 0,1	< 0,3
933	1	< 0,1	< 0,1	gestoord
947	2	< 0,1	< 0,1	gestoord
961	3	< 0,1	< 0,1	gestoord
975	7	< 0,1	< 0,1	< 0,3
989	10	< 0,1	< 0,1	< 0,2
1003	14	< 0,1	< 0,1	< 0,2

Enkele van de monsters die op de Sil 5 voor β -nortestosteron gestoord worden, zijn op de Finnigan 4500 met een Sil 19 kolom opnieuw geïnjekteerd.

Monster nummer	Dag	ppb in urine		
		Estrane-diol	α -nortestosteron	β -nortestosteron
5/5/				
947	2	niet gemeten	< 0,2	< 0,4
961	3	niet gemeten	< 0,2	< 0,4

Hormoonmengsel medroxyprogesteronacetaat/17 β -estradiolbenzooatMeetresultaten:

Dier nr. 3 en nr. 8 zijn behandeld met dit hormoonmengsel. Van dier 3 is de urine onderzocht.

HP MSD 5790 met CP Sil 5 kolom

Monster nummer	Dag	ppb in urine		
		Estrane-diol	α -nortestosteron	β -nortestosteron
5/5/				
915	-1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
929	1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
943	2	< 0,1	< 0,1	gestoord
957	3	< 0,1	< 0,1	gestoord
971	7	< 0,1	< 0,1	< 0,1
985	10	< 0,1	< 0,1	< 0,1
999	14	< 0,1	< 0,1	< 0,1

Enkele van de monsters die op de Sil 5 voor β -nortestosteron gestoord worden, zijn op de Finnigan 4500 met een Sil 19 kolom opnieuw geïnjecteerd.

Monster nummer	Dag	ppb in urine		
		Estrane-diol	α -nortestosteron	β -nortestosteron
5/5/				
943	2	niet gemeten	< 0,4	< 0,2
957	3	niet gemeten	< 0,4	< 0,2

